生物技術在蔬菜育種上之應用

劉邦基、張有明、許華欣
台灣省農業試驗所

前　言

一般言之，植物的生物技術包括組織培養、基因選殖、基因轉殖、遺傳標誌分析等四大項目。

組織培養可應用於大量繁殖、去病毒化、種原保存，並可與相關技術互相配合用以改良品種。基因之選殖與轉殖技術可克服傳統育種所無法克服的血緣障礙問題，以改良作物品種；應用遺傳標誌則可協助品種或品系之鑑別、了解作物血緣及演化關係、製作基因圖、提高選拔效率，並可協助達成基因選殖之目的。本講義主要就組織培養、基因轉殖和遺傳標誌及其在蔬菜育種之應用作一基本介紹。

組織培養在蔬菜育種上的應用

植物組織培養(tissue culture)意指將植物的器官、組織、或細胞等，在無菌狀態及適當環境下，使其重新形成完整植株。植物組織培養在蔬菜育種上的應用包括 1.以胚培養克服遠緣雜種胚的早衰； 2.以微體繁殖保存優良種質及搶救珍貴品種，或大量生產優良種苗； 3.以花藥培養培育優良品種及純系親本，加速育種進程； 4.種源保存； 5.以瓶苗方式進行種原交換； 6.以生長點培養法培育無毒種苗； 7.配合基因轉移以培育轉基因植株等。據不完全統計，至今組織培養已應用於四十餘種蔬菜上，且其應用日益廣泛。

組織培養包含一系列步驟，欲瞭解其技術之基本內涵，可從下列數個要項入手。

一、培植體

用於組織培養的植物材料稱培植體（explant），可大略分為具備組織化結構（organized structure）及未具組織化結構（unorganized structure）兩大類，前者包括胚、胚軸、子葉、生長點、莖頂、莖、花藥、根或葉之片段等等，後者包括癒傷組織、懸浮細胞、原生質體、花粉等等。培植體種類之選擇依試驗目的、方法及植物種類等各項因素而定。

二、培植體之消毒

培植體係以富含養分之無菌培養基培養，故需經表面消毒以防培養期間滋生真菌和細菌。消毒方法有多種，常用者為次氯酸鹽及酒精消毒法，此兩者不但經濟有效且對植物及人員之毒性較低。

次氯酸鹽可為次氯酸鈉或次氯酸鈣，尤以前者較普遍使用，市售之漂白液(例如 Clorox Bleach) 因以此為主要成分，常作為組織培養之消毒劑使用。使用時，其最終濃度可自 0.25 % 至 2 % (w/v) 不等，視植物與培植體之種類和消毒方式(例如處理時間)而定。

酒精(乙醇)之使用亦極為普遍，但一般是與其他藥劑配合，單獨使用時較不易達到完全消毒之效果。酒精除了可殺菌，尚可去除培植體外表之臘質。酒精之處理時間亦因材料及方法而異，一般言之，柔軟材料以 30~60 秒為宜，用以消毒種子則可達 1~2 分鐘。處理酒精後應隨即以無菌水沖洗 2~3 次。

其他之消毒劑尚有甲醇、異丙醇、殺真菌之藥劑、抗生素等。欲進行新作物之組織培養時，宜參考前人報告，參照相同或類似工作所用的方法，而且最好依其方式實施預備試驗，必要時修改其細節以找尋最理想的方式。

三、組織培養之操作環境

組織培養之多種操作應在無菌操作台上進行，包括將培植體置於培養基上，以開始培養工作，以及往後之繼代、更換培養基等，使其過程免於微生物(包括孢子)之感染。無菌操作台可置於實驗室之適當角落，但以置於清潔狀況良好之專門房間為最理想。

四、培養基

植物材料在試管中需有適當之培養基始能生存，進而生長發育。培養基含有主要元素與微量元素等礦物成分，其含量和比例關係著培養成敗。已建立之培養基配方種類甚多，其中最常用者首推ＭＳ配方，許多工作者在開始時係以此配方為基礎，建立其培養系統。除了ＭＳ配方，其他多種配方亦可使用，以應各種不同需要。培養基還需含有供作植物能源之含碳有機物(通常為蔗糖)，有時尚加入維生素或胺基酸等。此外，植物生長調節劑 (plant growth regulators) 之使用亦是植物組織培養技術的重要部分。工作者對於植物生長劑之掌握與調整是否適當，常是成敗關鍵。有關植物生長劑之基本概念請參考本節最後一段。培養基可為固態(即膠體狀態)或液態，視培養之材料與目的而定。

五、培養環境

植物材料在培養期間，大部份需要光線，通常係採用人工光照。人工光照易於控制光度、溫度及光週，有助於掌握其材料之生長速率和品質。使用 100~1000lux 之光度對許多植物初期的莖葉生長有益，但後期則常予增強(可高達 3000lux) 以利於移出試管後對環境之適應。有時組織培養需在無光或弱光環境下進行(例如癒傷組織之培養)，需視各種因素加以考量，以作調整。若使用光照，在光週之控制上常採用 12~16 小時光期，或依特定需要調整。

培養室之溫度亦甚重要，詳言之，溫度之適當與否與植物種類有關，例如溫帶作物以日溫 21~25 ℃及夜溫 18~21 ℃為宜，有些甚至喜愛更低之溫度；熱帶作物之培養一般則宜提高溫度，以 30 ℃左右為宜；然而，培養室內若同時培養多種不同植物，無法兼顧個別需要時，則常將溫度調整為 25 ℃。溫控之敏感度以± 1-2 ℃為宜。

一般培養室常以日光燈或植物燈作為光源。此種照明設施，其附於每一燈具之變壓器為極易發熱之部份，會影響室內溫度，增加溫控系統之負擔，若能將每一燈具之變壓器移置室外，則可改善此一缺點，並可節約能源。

六、植物生長調節劑

植物生長調劑(plant growth regular)為天然存在或人工合成之有機化合物，它們在極低濃度下可以影響甚至改變植物的發育與生長。天然存在於植物體內之生長調節劑又稱為植物荷爾蒙(phytohormone)。一般生長調節劑在極低濃度之範圍內，其濃度的變化亦會影響對植物的作用效果與方式。生長調節劑對植物發育之影響包括細胞之生長、分裂、器官之形成、種子發芽、休眠之促進與打破、向光性與向地性、成熟、老化等等。

表 1. 一般常見與常用之植物生長調節劑

1.生長素類(Auxins)：	
Indole-3-acetic acid (IAA)	p-Chlorophenoxyacetic acid (CPA)
Indole-3-butyric acid (IBA)	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
Indole-3-propioic acid (IPA)	(2,4-D)
a-Naphthaleneacetic acid (NAA)	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid
2,3,5-Triiodobenzoic acid (TIBA)	(2,4,5-T)
Phenylacetic acid (PAA)	t -Cinnamic acid
	Picloram
2.激勃素類(Gibberellins)：	
Gibberellic acids (GAs)，共數十種，以編號方式命名，最常用者為 GA_3	
3.開寧素類(Cytokinins)：	
Adenine	6-(γ-γ-dimethylallylamino)
Adenine hemisulfate	purine (2ip)
6-Benzylaminopurine (BA)	Kinetin
Diphenylurea	Zeatin
4.離層酸：	
Abscisic acid (ABA)	
5.乙烯：	
Ethylene	
2-Chloroethylphosphonic acid (Ethephon)	
6.其他：	
2-Chloroethyl-trimethyl ammonium chloride (CCC, Cycocel)	
Succinic acid-2,2-dimethyl-hydrazide (SADH, B9, Alar)	
Polyamines (PAs)	

植物生長調節劑可分為 1.生長素（ auxins ）、 2.激勃素（ gibberellins ，GAs ）、 3.開寧素(cytokinins，又稱細胞分裂素)、 4.離層酸(abscisic acid ， ABA)、5.乙烯(ethylene)等五大類，其中第 1~3 類皆各包含許多不同的化合物。此外，依其對植物的影響方式又可區分為促進劑(promoter)和抑制劑(inhibitor)兩大類，前者包括生長素、激勃素和開寧素，後者包括離層酸和乙烯以及多種人工合成之化合物。表 1 所列者為常見的植物生長調節劑。

完整的培養基可認為是由一套營養成分與一套生長調節劑所形成的組合。常用培養基之營養成分含量與比例較為固定，因而易於掌握；生長調節劑則富於變化而難以掌握。通常在一系列的培養過程中，可將營養成分配方固定，而生長調節劑則需隨材料種類、培養階段以及試驗目的加以調整或改變，始能達成組織培養之目的。其原因除了不同發育階段常需由不同調節劑引導而外，培植體之內生荷爾蒙含量亦為一重要變因，試驗者對此一變因通常無法知曉，因此難以確定外加生長調節劑所需之成分與劑量。

遺傳標誌及其在蔬菜育種之應用

一、遺傳標誌的種類

生物學上，同一性狀在不同個體間的變異性與多樣化稱為多型性(polymorphism)，例如同一種作物所呈現的不同花色、不同的抗病性、不同的外形等皆屬之。凡可作為辨認或推測生物遺傳特色之多型性現象稱為遺傳標誌（ genetic markers ）。遺傳標誌可大略分為形態標誌(morphological markers)、生化標誌(biochemical martkers)、分子標誌(molecular markers)等三大類。形態標誌為可直接從外形上辨識之多型性現象，例如株高、花色、茸毛之有無等差異性即是；生化標為經由化學反應結果所呈現之多型性，例如同功酶圖譜、 ELISA 、 HPLP 分析結果之差異性等；分子標誌則為核酸層次上所呈現的多型性現象，例如核酸電泳條帶的差異、 PCR 分析產物、核酸序列的異同等皆屬之。上述三種標誌中，以分子標誌的種類最多，數量亦最為豐富。近年來分子標誌進步甚為快速，應用亦最為廣泛。

分子標誌又可因是否結合 PCR 技術，而分為 non-PCR based markers 和 PCR based markers 兩大類（有關 PCR 請參閱本講義第四節），前者包括 RFLP 、 SSR 、 minisatellite 等；後者包括 RAPD 、 AFLP 等。

遺傳標誌分析時，若能從條帶上區分同質體(homozygote)與異質體(heterozygote)，稱為共顯性標誌 (co-domonant marker)；否則稱為顯性標誌(dominant marker)。

以下介紹幾種主要的遺傳標誌：

1.同功酶(isozyme)

同功酶是同一種酵素的不同形式，它們具有不同的分子量、電荷、

甚或其他差異性，但可進行相同的催化反應。同功酶的多型性現象可藉電泳方法顯示出來，是一種有用的生化標誌，且為共顯性標誌。探討同功酶標誌所需設備並不複雜，而且技術亦不難，可惜在分析方法上已開發之種類極為有限，形成應用上的局限性，如今其應用已不如分子標誌普遍。

2.RFLP

RFLP 是生物核酸的『限制酶切割片段之長度多形性』（ restriction fragment length polymorphism ）的簡稱，它是一種直接在核酸層面上測得的遺傳變異，其分析不需使用 PCR 技術，是一種 non-PCR based 的分子標誌。由於生物核酸被限制酶（ restriction enzyme ）完全分解後，會形成無數特稱為『限制酶切割片段』（ restriction fragments ）的核酸碎片，而相同的染色體部位所產生的限制段在不同的染色體組或生物個體之間可因核酸序列的變異而造成長度上的差異，因而可供辨認，且具有共顯性現象，此即 RFLP 現象。

RFLP 分析須仰仗多項基因工程技術始得實施。首先須藉重組 DNA 以及基因選殖技術以建立生物的基因庫（ gene library ）；基因庫可為基因組庫（ genomic library ）或互補核酸庫（ cDNA library ）。接著再從基因庫中篩選所需的核酸探針（ probe ），利用南方氏轉漬法（ Southern blotting ）去偵測生物基因組核酸的變異性。偵測時，須先利用特定的核酸限制酶去分解生物的基因組核酸（ genomic DNA ），以產生各種不同的切割片段，再用電泳方法使各片段因長度不同而分開來，以便於轉漬並與適當的探針結合。探針之目的是用來偵測某一生物的基因組中和它相同或十分近似的核酸序列之兩近側是否有序列上的變異。一般而言，凡能偵測到生物基因組中的單套序列或單套基因的探針最有利於結果的判讀，因此是最理想的探針。核酸探針須經標示（例如以放射性元素或非放射性方法標示）以利偵測。進行南方氏分析時，如果帶有探針序列的生物染色體部位在酶解後產生不同長度的片段，則經過一系列的實驗程序作業後便會顯現不同的條帶樣式，形成可供辨認的遺傳標誌。此種長度多形性意謂著：在生物個體或族群中，其基因組的某一位置存在著核酸序列的差異。其差異可能肇因於染色體片段之倒立（ inversion ）、插入（ insertion ）、缺失（ deletion ）、或氮基對替換（ base pair substitution ）等。

與其他多種分子標誌比較， RFLP 除了具有許多共通的優點(例如標誌數量極豐富、具有高靈敏性、其偵測結果不受發育階段影響等），還具有分析結果極為穩定以及共顯性效果(co-dominant)之優點。然而其分析步驟極為繁複費時，非一般實驗室可輕易實施，則為一大缺點。 RFLP 分析技術自 1980 年首度開發以來，在 1980 年代期間成為最重要的分子標誌，其應用頗為廣泛，但進入 1990 年代後，即逐漸為其他分子標誌所取代。

3. RAPD

RAPD 是『逢機增幅多型性核酸』(Randomly Amplified Polymorphism DNA)的英文簡稱，它是一種應用『聚合酵素聯鎖反應』(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法所延伸發展，以偵測生物遺變異性的技術。 RAPD 分析所根據的基本原理的方法，其實與一般 PCR 分析並無二致，不同的是 RAPD 只用隨意設計的單一引子進行增幅反應，因此不需瞭解增幅區的核酸序列；此外， RAPD 分析所用的引子通常比較短，常用者為 10 mers 。一般言之，以 10-mer 之逢機引子進行 RAPD 分析，在一般常用之 PCR 反應程式上皆可產生增幅條帶，少則 1~2 條，多則可達十餘條。

RAPD 標誌之分析方法較為簡單易行，且靈敏度極高，為其優點，但不具共顯性現象，且穩定性較低，則為其缺點。

4. VNTR

VNTR 是『不同數目連續重複序列』(Variable Number of Tandem Repeats)之英文簡稱。高等生物的基因組中常有連續重複的簡單序列存在，其重單位列長度為 2~8 個鹼基對者，稱為 SSR(Simple sequence repeat)或 microsatellites ；而長度為約 16~100 個鹼基對者，稱為 minisatellite 。由於重複次數的不同，當以適當之探針進行分析時可顯示多型性(參閱 RFLP 之條帶偵測方法)。

VNTR 標誌分析亦可與 PCR 結合，以緊鄰重複單元兩側之非重複序列為引子，進行增幅，再以電泳觀察其條帶。其所增幅之條帶通常較 RAPD 單純，而且可能具有共顯性效果。

5. AFLP

AFLP 是『增幅片段長度多型性』(Amplified Fragment Length Polymorphism)的英文簡稱。 AFLP 融合 RFLP 和 PCR 之特點，其分析較 RFLP 簡單，分析效果則較 RAPD 穩定。 AFLP 分析時，首先須將試驗材料的基因組核酸（ genomic DNA ）用兩種限制酶切割。所用之兩種限制酶中，一種為稀有切位者（其辨認之序列較為稀少），另一種則為普通者（其辨認之序列在核酸中較為常見）。切割後之片段則加入小段之核酸片刻，並以聯結酶接合。此種外加之小段核酸，稱為 adaptor ，其序列為已知者，故可作為 PCR 引子之設計依據。其 PCR 引子除了使用上述 adaptor 及限制酶之序列外，在 3'端尚特地增加 1~3 個額外鹼基對，此增加之鹼基對的核苷酸種類係隨意選擇者，目的是要減少 PCR 反應之煉合機率從而減少增幅條帶數目；所增加之鹼基對越多（但以不超過 3 個為宜），反應後之電泳條帶數目越少。進行 AFLP 分析時，其 PCR 產物是以 PAGE（參閱本講義第五節）分離，其膠體與核酸定序所用者相同。為使泳後之條帶易於觀察，一般使用放射標記或螢光標記之引子，再配合 X-ray 底片顯影。有些公司已設計出全自動之硬體設施，以降低工作者所負擔之繁複手續。

AFLP 分析效果穩定且重複性甚高；此外，同一份分析結果常可顯示數個或更多的多型性標誌，因此分析效率可大幅提高。若使用膠體掃描器（gel scanner）以判斷條帶訊號之強弱，還可將同質體（homozygote）和異質體（heterozygote）之條帶加以區分，而使 AFLP 具有共顯性（co-dominant）特色；否則本標誌因無法區分同質體與異質體之條帶，而與 RAPD 同被歸為顯性標誌（dominant marker）。

基因轉移

基因轉移(gene transfer)又稱為基因轉殖，意指將外來基因送入植物細胞，使該外來基因整合到植物基因組且能正常表現，由此所獲得之植物稱為轉基因植物(transgenic plant)。基因轉移可針對特殊性狀進行改良，不致影響其他遺傳特性，而且不受植物血緣之限制。已知植物的基因轉移方法不下十餘種，包括農桿菌媒介法、電穿孔法、 PEG 化學處理法、微注射法、基因鎗法、花粉管途徑法、電泳法、脂球體法、浸泡培養法等，各種方法皆有其優缺點，其應用之普遍程度亦不一，以下介紹幾種主要之轉移技術。

一、農桿菌媒介法（Agrobacterium mediated method）

本法係藉由農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或農桿根群菌（*A. rhizogenes*）利用其所攜帶之 Ti 或 Ri 質體以達到基因轉移之目的。Ti 或 Ri 質體為發現於該菌中之質體，含有一段特稱為 T-DNA（transferrd DNA）之部分，基因轉移即是利用 T-DNA 之特性而達成的。當農桿菌感植物時，受到植物傷口分泌的酚化物之誘導，活化 Ti 質體的 vir region，所產生的酵素可以幫助 T-DNA 由細菌細胞內轉移到植物細胞，並且併入植物染色體中，與植物的基因一起表現出來。以 Ti 質體轉移基因具有穩定之效果，為其顯著之優點；可惜農桿菌只感染雙子葉植物，在單子葉植物之基因轉殖上較不易應用。如今，已有多種經過巧妙改造的 Ti 質體可供基因轉移之需。目前經由農桿菌媒介法而獲得轉基因植物之報告已甚為豐富，成功的例子至少包括番茄、菸草、甜椒、馬鈴薯、木瓜和柑桔等。

二、基因鎗法（biolistic process）

本法係利用一種稱為 particle gun（粒子槍）的裝置，將帶有外來基因的重組質體射入植物細胞，以達到基因轉移效果。Particle gun 又稱為 gene gun（基因槍），是一九八四年由康乃爾大學的 San-ford 教授首先發展成功的。其基本原理是將質體 DNA 溶於緩衝液中，以液膜方式包被在極細微的金屬粒子外面，再利用基因槍將金屬微粒加速到每秒 300 公尺以上，而射入植物細胞中，把 DNA 一併帶入，藉以發生基因轉移。此設施及方法經由杜邦公司繼續發展而達到商品化階段，一般又稱為高速微導彈法（high-velocity microprojectile）、顆粒轟炸法(particle bombardment process)或生物彈道顆粒法（Biolistic bioparticle delivery system）。其中 biolistic 係由 biological ballistic（意即生物彈道的）兩字合併而成的新字。本

法須用高密度之金屬作為微細粒子之材料，以增加射入效果。初期採用鎂元素之微細粒子以達到此目的；但由於過多的鎂射入細胞會產生毒害而影響其存活和再生能力，遂改用金或鎢為材料。本法之使用頗稱簡便，適用範圍亦廣。就植物種類而言，可適合於雙子葉植物和單子葉植物，對植物部位之選擇亦不嚴苛，舉凡癒傷組織、子葉、胚、胚軸、葉圓片（leaf disks）、原生質體和懸浮培養之細胞等皆可使用，甚至可用於葉綠體和酵母菌之基因轉移試驗，亦可用於真菌、細菌、昆蟲的胚和動物組織。至今為止，本法在植物上至少已用於菸草、小麥、大豆、洋蔥、玉米、木瓜、和水稻等多種作物之遺傳工程研究，許多研究顯示本法具有理想的基因轉移效果。

三、電穿孔法（electroporation）

本法利用瞬間電襲，使細胞膜產生暫時性孔洞，而使重組質體併入原生質體內。其效果受到細胞濃度、緩衝液、電壓、脈衝時間、和原生質體之狀況等諸多因素之影響。在水稻、胡蘿蔔、菸草、和玉米等作物已有初步之結果；然而，一般而言，本法之轉移效率極低而且不穩定。

四、微注射法（microinjection）

本法係利特殊的微注射針管將重組質體注入細胞內。所試驗之植物細胞需先經酵素處理以成為原生質體。此方法似以施用於受精卵較具應用價值，尤以動物試驗較具可行性。施用於植物則效果並不理想，而且轉殖細胞之再生情況通常不佳，故不易獲得轉基因植株。

五、花粉管路徑法（pollen tube pathway）

此方法原為中國大陸學者所構思者，在大陸使用較為普遍。本技術是將受精後之柱頭切斷，再將重組質體滴在切口上，使其由花粉管進入，最後併入受精卵中而發生基因轉移。本法是以受精卵為材料，不須克服再生（regeneration）之難關，因此無需使用組織培養技術，而且對於某些植物，例如由一朵花之受粉可獲得眾多種子者（例如番茄、木瓜），可提高試驗效率，因此頗具吸引力，本法目前在國內亦頗受重視。

主要之基本技術與工具

生物技術為一種應用性的科技，使用到許多不同學門的理論與技術，其設施亦較為複雜。因此，生物技術工作者需學習多種基本知識與技術，以應工作需要。以下介紹幾項初學者需先熟悉之技術與工具。

一、植物 DNA 之萃取

萃取植物 DNA 之方法有許多種，其繁簡及優劣不一，但各種方法皆可大體分為以下四個主要步驟 ：

1.細胞的碎裂。一般使用研磨方式，植物組織(通常為葉片)在研磨前，一般是

以液態氮急速冷凍，以利於將組織研磨成微細之碎片（每一碎片以不超過30 個細胞為最理想），使細胞壁破裂而易於釋出其內容物。此一研磨程序越迅速越佳，以使材料處在低溫狀態中，降低 DNA 產生質變的機會。也可先將植物組織進行冷凍乾燥，再以磨粉機磨成粉狀，以-20 ℃或-4 ℃貯存，或者萃取時再行磨粉亦可。

2.DNA 與蛋白質的分離。當細胞壁破裂後，則加入適當之溶解液（ lysis buffer ），溶解液中含有可破壞細胞膜和核膜之藥劑，通常為 1%左右之 SDS （ sodium dodecyl sulfate ）、 sarkosyl 、 CTAB （ cetyltrimethyl ammonium bromide ）等高純度之清潔劑。清潔劑亦有助於 DNA 與蛋白質以及多糖類之分離，此步驟對於降低污染及提高 DNA 純度極為重要。為了使清潔劑迅速發生作用，本步驟在執行時需適度搖晃以加速混合，但切忌過度搖晃，以免造成 DNA 分子大量斷裂，影響其品質。此外，溶解液需具極佳之酸鹼緩衝能力，通常以 pH 7.4~8.0 之酸鹼值最有利於 DNA 分子之隱定。

3.蛋白質及其他雜質之去除。經過清潔劑處理後，許多萃取方法係以酚洗法（ phenol wash ）除去蛋白質及多種雜質(包括核酸分解)。完整的酚洗程序包括三個步驟，首先加入酚（其量與樣品體積相等），充分混合後，再行離心並留取上層液（含 DNA ），再以酚和三氯甲烷（ chloroform ，含 4% 之 isoamyl alcohol ）之 1:1 混合液處理（其量亦與樣品體積相等），經混合、離心、留取上層液（含 DAN ），最後再以三氯甲烷（成份同前，體積亦與樣品等量）處理，留取上層液。此時大部份的雜質皆已去除。也有人在此階段採用 Proteinase K 蛋白酶加強蛋白質之分解。亦有以氯化銫（ CsCl ）梯度法進行純化者，此法雖具極佳純化效果，但較為昂貴、費時，且需使用超高速離心機。

4.DNA 的進一步純化。經過上述三大步驟後，通常以乙醇或異丙醇（ isopropanol ）將 DNA 沈澱，有時並加入醋酸銨以加強效果；此步驟亦且有去除鹽類之效。沈澱後之 DNA 經離心並適度乾燥後（切忌過度乾燥）便可溶於適量之 TE 溶液（含 10 mM Tris Cl ， 1 mM EDTA ， pH 7.4~8.0 ）或純水中備用。

二、酵素之使用

1.限制酶（ restriction enzyme ）

限制酶又稱為核酸內切酵（ endonuclease ），此類酵素存在於細菌中，是細菌用以保護其自身免被噬菌體（ phage ）侵害的武器，不同細菌含有不同的限制酶作為其防禦工具。當噬菌體入侵細菌後，細菌內之限制酶可將噬菌體核酸切成片段以免除其危害。其原理是每一種限制酶可辨認一種特殊的核酸序列（稱為切位序位），從而將其螺旋狀之雙股切斷；而細菌自身所含有之相同切位序列則具有特殊保護（通常在適當位置行甲基化以為保護措

施），以免被自身所特有的限制酶所切斷，因此僅有侵入之外來核酸可被破壞而達到自我保護之目的。

限制酶可分為 type I 和 type II 兩大類，前者可與外來核酸分子長鍊之某一特殊位置結合，而將結合處以外之位置將核酸分子切斷；後者則與特殊位置（序列）結合並將該處切斷。其切割方式有兩種，一種是將兩股之同一位置切斷，形成平整之切口，另一種方式則是在兩股之不同位置切斷形成不平整之切口。 type II 限制酶經常使用於生物技術究上，以作為核酸切割之工具。

2.連結酶（ ligase ）

為具有連結 DNA 片段功能之酵素，它可在核苷酸間形成 phosphodiester bond （需有 5’-phosphate 和 3’-hydroxyl groups 存在）。生物技術試驗常使用 T4 ligase （為 T4 噬菌體所控制而產生者）來連結不同來源之 DNA 片段，形成重組核酸。限制酶與連結酶之開發與應用為基因工程技術發展之重要基礎。

三、電泳（ electrophoresis ）

電泳為分離蛋白質或核酸分子的方法，是生物技術必備的基本技術。電泳之基本原理是將供試材料（即所萃取之蛋白質或核酸材料）置於適當膠體中，膠體則置於緩衝液及電場中，如此帶電之分子便會依其電荷移動，經一段時間，不同之分子便分離開來。電泳依膠體之不同可分為澱粉電泳、聚丙醯胺膠電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis ，簡稱 PAGE)、和瓊脂電泳（ agarose gel electrophoresis ）等三種。第一種用於蛋白質分析，第二種可用於蛋白質和核酸分析，第三種用於核酸分析。膠體之密度可依需要於配製時調整，以控制分子之移動速率及解像力。蛋白質電泳可依不同目的採用特殊染劑加以染色以觀察特定之分子，例如測定全蛋白質時，需於電泳前將材料加熱使其變性，電泳後則以 coomassie blue 染色；不同之同功酶則各有其染劑配方及染色方法。核酸電染則通常使用 ethidium bromide 染色，再在螢光下觀察其條帶。蛋白質和核酸分子之移動與其分子量有關，因此可經由 Rf 值計算或在同一膠片中『分子量標誌』（ molecular weight markers ）以資比較，而得知各條帶中之分子所具之分子量。

四、聚合酶聯鎖反應技術（ polymerase chain reaction ）

簡稱 PCR ，是 1984 年首次發展成功的一項技術，它可以在很短的時間內，將某一段特定的DNA序列進行大量的複製，而使得原先極微量的DNA大量增加，以利於研究。其原理，是利用適當溫度，將核酸的引子（ primer ）與高溫（通常為 94 ℃）解鍊後的單股 DNA 煉合（ annealing ），再利用核酸合成酵素進行引子的延伸作用（通常使用 72 ℃）；最後將延伸後的 DNA 再經高溫解鍊成單股，以便再度進行引子的煉合。如此週而覆始，所合成的 DNA 便以 2^n 的速率急速地增加，由於它能極有效地變少為多，許多實際上的應用馬上應運而生，而成為分子生物學的一項極有用的新技術，有人甚至聲稱 PCR 為生物技術中的一匹黑馬。熟悉此一新技術的內涵已成為每位生物技術研究人員的必修課題。

早期的PCR是使用大腸菌DNA聚合酶來作實驗，由於該酵素對溫度極敏感，在利用高溫進行解鍊時便會失效，故十分不便。直到 1988 年，從溫泉中的細菌 *Thermus aquaticus* （*Taq*）中分離而後亦選殖成功的 Taq DNA 聚合酶問世以來，才使 PCR 技術真正邁向實用的領域。 Taq 聚合酶的分子量約為 94kD ，它可以在 95 ℃的高溫下保持安定性。在 80 ℃時，每個酵素分子可以每秒 150 個核苷酸之速率進行 DNA 的聚合反應；在 37 ℃時，其活性則約降低百倍。由於此酵素在 DNA 聚合反應進行時沒有自我校正的功能，使得合成核酸時發生錯誤的機會大為提高，在 30 循環反應後，其累積錯誤頻率可達 0.25 %，實為一大缺點。近年來，由於分析方法的改進，已使其錯誤的機率大為降低，達到理想狀況。最近其他更理想酵素陸續開發出來，加上各種硬體設計之改進，已使 PCR 技術更臻成熟。 PCR 技術自發展成功至今雖僅十餘年，但其應用價值則已廣受肯定。至今為止，其主要應用範圍包括：考古學、醫學、生物學、犯罪學、與農業等各大領域。在農業上， PCR 可用於植物病毒之診斷、純化有用的基因或 DNA 段落、以及品種品系之鑑定上。

實驗室與、田間之注意事項以及生態方面之安全考量

生物技術之許多試驗工作涉及環境及人員安全，因此工作人員需具備細心的工作習慣，且需有高度的安全意識。

一、實驗室

除了遵守一般實驗室安全守則而外，需注意下列項目：

1.工作人員之安全防護措施：在實驗室工作時需穿實驗衣，舉凡具有潛在危險性之工作項目，皆需格外小心。例如許多工作之執行需戴手套，實驗桌上應敷一層抗污紙墊，並定期或視需要更換，使用紫外燈時應戴防護面具或眼罩，使用具放射性藥物時需有合格之防護設施，並隨時以蓋格計數器檢測是否遭到污染。

2.有毒物質之處理：試驗藥物具有毒性時，除了操作時應注意人員安全外，必要時需依規定在抽氣櫥中操作。對於試驗後之廢棄藥品應予回收保存，以便交由適當人員或公司處理，不可倒入水槽中，以防污染下水道。

3.細菌及試驗材料之處理：凡涉及實驗用細菌之相關器物及植物材料，於實驗結束後皆需連同細菌本身加以適當處理，一般可採用高溫高壓滅菌（常 120 ℃， 30 分鐘），以保証其不具污染能力，然後才可丟棄。

4.放射性物質之處理：若需使用同位素藥品，需嚴格遵守行政院原子能委員會所頒訂之法令。包括工作執行人員事前需接受相關訓練且持有証明，實驗室之設施需符合法令規定，同位素之購入、貯存及其廢棄物之處理亦需接受監督及管制，工作人員還需定期接受健康檢查。

二、溫室與田間試驗

生物技術所進行之基因轉殖可不受血緣限制，而且所轉殖者亦不限於自然界所存在之基因（未來亦可能出現人造基因之轉殖事例），對於可能引發的種種問題，包括對人体健康的影響、生態環境效應、社會倫理的衝擊等等，目前皆乏充分了解，因此學界與一般社會大眾對生物技術所培育出之轉基因植物存在著相當疑慮。為了安全考量，許多國家皆制定相關法規予以監控，我國有關轉基因植物的安全法規亦已在草擬階段。目前國內相關之溫室與田間試驗係由行政院農業委員會負責管理，任何相關之研究，皆需向農委會申請，以依照農委會決議實施。

主要參考資料

中國農業科學院主編。1984。中國蔬菜栽培學。農業出版社。

朱蓓蓓、林良平。1989。新興之細胞電融合技術。科學農業 37(1-2):26-29。

李寶健、曾慶平。1990。植物生物技術原理與方法。湖南科學技術出版社。

吳信淦、連錦昆。1991。基因轉殖植物之研究。科學發展月刊 18(5):556-560

吳希天、黃木秋。1991。電孔處理轉移基因之原理與影響因素。科學農業 39(11-12): 256-264。

高景輝 1990。植物生長與分化。台北，茂昌圖書有限公司。

高景輝 1994。植物荷爾蒙生理。台北，華香園出版社。

張銘堂。1988。植物基因移轉。科學農業 36(1-2):1-8。

廖芳心、黃鵬林。1996。應用花粉管轉移甘藍基因注射處理時間之探討。中國園藝 42(3): 289-301。

Hartmann, H.T., D.E. Kester, and F.T. Davies, Jr. 1990. Plant propagation, principles and practices (5th ed.). Prentice-Hall International. Englewood Cliffs, New Jersey.

Hoelzel, A.R.(ed.), 1992. Molecular genetic analysis of populations, a practical approach. IRL Press, New York.

Rickwood, D. and B.D. Hames (eds.), 1990. Gel electrophoresis of nucleic acids, a practical approach, 2nd ed. IRL Press, New York.

Vasil, I.K. and T.A. Thorpe (eds.), 1994. Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Boston.